

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 6  
A61K 31/43

(45) 공고일자 2001년02월01일  
(11) 공고번호 10-0281003  
(24) 등록일자 2000년11월14일

(21) 출원번호	10-1998-0035010	(65) 공개번호	특2000-0015230
(22) 출원일자	1998년08월27일	(43) 공개일자	2000년03월15일
(73) 특허권자	이명구 충청북도 청주시 분평동 237번지 우성아파트 206동 508호		
(72) 발명자	이명구 충청북도 청주시 흥덕구 분평동 우성아파트 206동 508호 노재섭 충청북도 청주시 흥덕구 봉명동 1295번지 8통 1반 이경순 충청북도 청주시 흥덕구 봉명2동 삼정아파트 1동 206호 이상선 충청남도 천안시 성정동 697-3번지		
(74) 대리인	이한영		

심사관: 이유형

(54) 모노아민 산화효소 저해활성을 가지는 프로토페르베린 알카로이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 항우울제

요약

본 발명은 모노아민 산화효소 저해활성을 가지는 프로토페르베린 알카로이드 화합물인 코프티신(coptisine), 베르베린(berberine) 또는 팔마틴(palmatine)을 유효성분으로 함유하는 항우울제에 관한 것이다. 본 발명자들은 200여 가지의 천연물로부터 제조된 메탄을 추출물에 대하여 모노아민 산화효소(monoamine oxidase, 'MAO') 저해활성을 검색하여, 황련(Coptis japonica)이 강력한 MAO 저해물질을 함유하고 있음을 발견하고, 황련 추출물의 용매별 분획을 제조하여 각 분획의 MAO 저해활성을 조사하였다. 가장 우수한 저해효과를 보인 부탄올 분획을 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 4개의 소분획으로 분리하고, TLC로 각 소분획의 성분을 분석하여, 소분획 I~III의 주성분은 베르베린(berberine)과 팔마틴(palmatine)이고, 소분획 IV의 주성분은 코프티신(coptisine)임을 확인하였다. 전기 세 가지 화합물들은 모두 실험실적 조건에서 효과적으로 MAO 활성을 저해하였으며, 레제르핀에 의한 체온강하에 대한 길항효과를 보였다. 이와 같이 코프티신, 베르베린 및 팔마틴은 생체내 신경전달물질인 모노아민 류를 불활성화시키는 것으로 알려진 모노아민 산화효소의 활성을 강력하게 저해하므로, 본 발명의 항우울제는 우울증 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

대표도

도2a

명세서

도면의 간단한 설명

제1(a)도는 베르베린(berberine)에 의한 모노아민 산화효소 활성 저해효과를 나타내는 그래프이다.

제1(b)도는 팔마틴(palmatine)에 의한 모노아민 산화효소 활성 저해효과를 나타내는 그래프이다.

제1(c)도는 코프티신(coptisine)에 의한 모노아민 산화효소 활성 저해효과를 나타내는 그래프이다.

제2(a)도는 레제르핀(reserpine)에 의한 체온강하에 대한 코프티신의 길항효과를 나타내는 그래프이다.

제2(b)도는 레제르핀에 의한 체온강하에 대한 베르베린의 길항효과를 나타내는 그래프이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 모노아민 산화효소(monoamine oxidase) 저해활성을 가지는 프로토베르베린 알칼로이드(protoberberine alkaloid) 화합물을 유효성분으로 함유하는 항우울제에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 황련(*Coptis japonica*)으로부터 분리된, 모노아민 산화효소 저해활성을 가지는 프로토베르베린 알칼로이드 화합물인 코프티신(coptisine), 베르베린(berberine) 또는 팔마틴(palmatine)을 유효성분으로 함유하는 항우울제에 관한 것이다.

모노아민 산화효소(monoamine oxidase, 이하, 'MAO'라 약하기로 함)는 대부분의 척추 및 무척추동물에 포함되어 있는 효소로서, 세포내의 미토콘드리아 외막에 존재하며, 신경전달물질로 작용하는 활성 모노아민(monoamine) 류인 카테콜아민(catecholamine) 즉, 노르에피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine) 및 도파민(dopamine) 등과 세로토닌(serotonin) 등을 불활성화시키는 FAD 함유효소이다(참조: Nagatsu, T., et al., *Enzymologia*, 39:15-25(1970)). MAO는동물의 중추신경계와 말초신경에 걸쳐 광범위하게 분포되어 있고, 중추신경계의 신경활동에 중요한 역할을 하며, 장관,혈소판 및 간장 등에서는 외인성 아민(amine)류를 대사, 분해함으로써 생체 방어기구로서의 역할을 하는 것으로 알려져있다(참조: Nissinen, E., *J. Chromatogr.*, 309:156-159(1984)).

MAO는 기질 및 저해제의 특이성에 따라 MAO-A 및 MAO-B로 분류된다(참조: Fowler, C., et al., *Biochem. Pharmacol.*, 28:3063-3068(1979)). MAO-A는 노르에피네프린, 세로토닌 등을 기질로 하며, MAO-A 특이적 저해제로는 클로질린(clorgyline), 하르민(harmine), 하르말린(harmaline) 등이 알려져 있다(참조: Donnelly, C.H. and D.L. Murphy, *Biochem. Pharmacol.*, 26:853-858(1977)). MAO-B는 베타-페닐에틸아민( $\beta$ -phenylethylamine), 벤질아민(benzylamine) 등을 기질로 하며, 디프레닐(deprenyl), 파르질린(pargyline) 등에 의하여 비가역적으로, 이미프라민(imipramine), 아미트리프틸린( amitriptyline) 등에 의하여 가역적으로 저해된다(참조: Yang, H.Y.T. and N.H. Neff, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 189:733-740(1974)). 한편, MAO-A와 MAO-B는 모두 티라민(tyramine), 도파민 및 키누라민(kynuramine) 등을 기질로 사용할 수 있으며, 이프로니아지드(iproniazid), 니알라미드(nialamide) 및 페넨진(phenelzine) 등은 MAO-A 및 MAO-B를 모두저해한다(참조: Houslay, M.D. and K.F. Tipton, *Life Sci.*, 19:467-478(1976)). 이외에도, MAO 저해활성을 가진 화합물로는 살소리놀(salsolinol), N-메틸-노르살소리놀(N-methyl-norsalsolinol), N-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), N-메틸이소퀴놀리니움 이온(N-methylisoquinolinium ion), 비페멜레인(bifemelane), 3,4-디히드록시페닐세린(3,4-dihydroxyphenylserine) 등의 퀴놀린(quinoline), 카테콜(catechol) 계열화합물, 인돌(indole) 및 이사틴(isatine) 유도체 등이 알려져 있다.

중추성 MAO의 활성은 우울증 등의 정신질환과 관련되어 있으며, 말초성 MAO의 활성은 고혈압 등의 질환과 관련되어 있는것으로 알려져 왔다. 이와 관련하여, MAO 저해제는 뇌중 도파민 함량을 상승시키고, L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로부터 생합성된 도파민의 약리작용을 증대시킨다는 사실이 밝혀진 바 있으며, 우울증, 알콜중독 또는 정신분열 등의 병인으로 비정상적인 MAO 활성이 작용할 수도 있는 것으로 추측되고 있다(참조: Riederer, P. and M.B.H. Youdim, *J. Neurochem.*, 46:1359-1365(1986); Naoi, M. and T. Nagatsu, *Life Sci.*, 40:1075-1082(1986); Cross, A.J. and M.H. Joseph, *Life Sci.*, 28:499-505(1981)).

#### 발명이 이루고자하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 MAO 활성 저해효과를 가진 천연화합물을 이용한 항우울제를 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과,천연물인 황련(*Coptis japonica*)에 강력한 MAO 저해활성을 가진 성분이 함유되어 있으며, 이들이 이소퀴놀린 계열의 프로토베르베린 알칼로이드(protoberberine alkaloid) 화합물인 코프티신, 베르베린 및 팔마틴임을 규명한데 이어, 전기 세가지 화합물들이 효과적인 항우울제로서 사용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

결국, 본 발명의 목적은 MAO 저해활성을 가지는 프로토베르베린 알칼로이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 항우울제를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

본 발명자들은 200여 가지의 천연물로부터 제조된 메탄을 추출물(extract, 이하 '엑스'라 하기로 함)에 대하여 모노아민 산화효소(monoamine oxidase, "MAO") 저해활성을 검색하여, 황련(*Coptis japonica*)이 강력한 MAO 저해물질을 함유하고 있음을 발견하고, 황련 엑스의 용매별 분획을 제조하여 각 분획의 MAO 저해활성을 조사하였다. 가장 우수한 저해효과를 보인 부탄올 분획을 칼럼 크

로마토그래피를 이용하여 4개의 소분획으로 분리하고, TLC로 각 소분획의 성분을 분석하여, 소분획 I~III의 주성분은 베르베린(berberine)과 팔마틴(palmatine)이고, 소분획 IV의 주성분은 코프티신(coptisine)임을 확인하였다. 전기 세 가지 화합물들은 모두 실험실적 조건에서 효과적으로 MAO 활성을 저해하였으며, 레제르핀에 의한 체온강하에 대한 길항실험 결과는 이들이 항우울제로서 바람직하게 사용될 수 있음을 제시하였다.

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

본 발명자들은 MAO 활성을 저해하는 작용기전을 가진 새로운 항우울제를 개발하기 위하여, 200여 가지의 천연물로부터 제조된 메탄올 엑스와 마우스의 뇌로부터 분리된 MAO 조효소액을 사용하여, MAO 저해성분을 함유하는 천연물을 선별하였다. 시험한 천연물 중에서 황련의 저해효과가 가장 우수한 것으로 판명되었는데, 황련은 전통생약으로서 살균효과, 정장효과 및 항궤양효과 등이 있는 것으로 보고되고 있으며, 반하사심탕, 정장제 및 안신환 등의 제제에 함유되어 정신불안 등의 치료에 사용되고 있다. 또한, 황련은 알칼로이드(alkaloid)로서 베르베린, 팔마틴, 코프티신 및 마그노플로린(magnoflorine) 등을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 전기 황련의 메탄올 엑스로부터 디클로로메탄, 에탄올아세테이트, 부탄올 및 물분획을 순차적으로 제조하여, 각 분획의 MAO 저해활성을 조사한 결과, 주로 부탄올 분획에 활성물질이 함유되어 있음을 확인하였다. 따라서, 전기 부탄올 분획을 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 4개의 소분획으로 분리한 다음, 각 소분획을 TLC로 분석하여, 소분획 I~III의 주요성분이 베르베린 및 팔마틴이고, 소분획 IV의 주요성분이 코프티신을 규명하였는데, 전기 화합물들은 모두 이소퀴놀린(isoquinoline) 계열의 프로토베르베린 알칼로이드(protoberberine alkaloid) 화합물이다. 전기 세 가지 화합물들의 MAO 저해도 및 저해양상을 조사한 결과, 베르베린과 팔마틴은 비경쟁적으로, 코프티신은 경쟁적으로 MAO를 강력하게 저해하는 것으로 밝혀졌다. 보다 구체적인 항우울성 조사 실험으로서, 마우스를 이용하여 레제르핀에 의한 체온강하에 대한 길항실험을 실시하여, 코프티신, 베르베린 및 팔마틴이 항우울제 개발에 이용될 수 있음을 확인하였다.

이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1: 여러가지 식물 엑스의 모노아민 산화효소 저해활성 검색][실시예 1-1: 식물 엑스의 제조] 모노아민 산화효소(monoamine oxidase, 이하 'MAO'로 약함) 저해 활성물질을 함유하는 천연물을 검색, 선별하고자, 황련, 지모, 천궁, 황금, 계피나무, 전동싸리, 탕자나무, 다릅나무, 배초향, 산초나무, 오수유, 인동덩굴, 정향나무 등 시중에서 구입하거나 또는 본 발명자들이 직접 채집한 200여 가지의 식물로부터 다음과 같은 방법으로 추출물(extract, 이하, '엑스'라 하기로 함)을 제조하였다: 음건한 식물을 잘게 절단하거나 또는 분쇄하여 밀봉 가능한 병에 넣고, 시료가 완전히 잠길 정도의 95% 메탄올을 가한 다음, 상온에서 3일간 방치하는 냉침과정을 2회 반복하였다. 이어서, 전기 메탄올 추출액을 회수하여 여과한 다음, 회전감압농축기를 사용하여 60℃에서 감압농축하여 엑스를 제조하고, 이를 4 내지 7℃에 보관하였다.

[실시예 1-2: MAO 조효소액의 제조] 전기 실시예 1-1로부터 수득한 식물 엑스들의 MAO 저해활성을 검색하는데 사용하고자, 나오이(M. Naoi) 등의 방법에 따라 마우스의 뇌로부터 MAO 조효소액을 제조하였다(참조: Naoi, M. and T. Nagatsu, J. Neurochem., 50:243-247(1988)). 즉, 마우스를 단두하고 뇌를 분리하여 세절한 다음, 0℃를 유지하면서 3배 부피의 0.25M 수크로스를 함유한 10mM 인산칼륨 완충액(pH 7.4)을 가하고, 균등기(homogenizer)를 사용하여 균질화시켰다. 전기로부터 수득한 균질질(homogenate)을 1,200×g로 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음, 이를 다시 16,000×g로 20분간 원심분리함으로써 침전물을 회수하여, 100 내지 300mg/ml의 농도가 되도록 10mM 인산나트륨 완충액(pH 7.4)으로 현탁시켰다. 이 때, 단백질 농도는 로오리(Lowry)의 방법(참조: J. Biol. Chem., 193:265-267(1951))에 따라 우혈청 알부민(bovine serum albumin)을 표준단백질로 사용하여 측정하였다. 이와 같은 방법으로 제조된 MAO 조효소액을 후술하는 실시예에 사용하기 위하여 -20℃에 보관하였다.

[실시예 1-3: MAO 활성 측정] MAO 활성 측정시 전기 실시예 1-1로부터 수득한 식물 엑스들은 5mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 용해시켜 사용하였으며, 완전히 용해되지 않는 경우에는 상등액을 취하여 사용하였다. 한편, MAO의 기질로서는 키누라민(kynuramine, Sigma Chemical Co., USA)을 500μM 농도로 증류수에 용해시킨 다음, 0℃에 보관하면서 사용하였다. MAO의 활성은 기본적으로 크라즐(M. Krajl)의 방법에 따라 측정하였으며(참조: Krajl, M., Biochem. Pharmacol., 14:1683-1685(1965)), 구체적인 방법은 다음과 같다: 반응튜브에 0.2M 인산칼륨 완충액(pH 7.4) 720μl, 조효소액 30μl, 식물엑스 수용액 50μl를 가하고, 잘 혼합한 다음, 37℃에서 5분간 배양하였다. 그런 다음, 키누라민(500μM) 200μl를 가하여 효소반응을 진행시키고, 30분후 10% 황산아연 250μl와 1N 수산화나트륨 50μl를 가하여 반응을 종결시켰다. 전기 반응액을 3,000×g에서 5분간 원심분리하고, 상등액 700μl를 취하여 1N 수산화나트륨 1.4ml를 가한 다음, 반응산물인 4-하이드록시퀴놀린(hydroxyquinoline)의 농도를 형광광도계(Model F-3000, Hitachi, Japan)를 사용하여 정량함으로써 MAO 활성을 측정하였다. 이때, 대조군 MAO의 활성은 0.309±0.018nmol/min/mg 단백질이 되도록 조정하여 사용하였고, K

m,  $V_{max}$  및  $K_i$  값은 라인위버-버크(Lineweaver-Burk) 법으로 계산하였다.

그 결과, 황련 엑스를 처리한 경우에, MAO의 활성은 대조군의 13.1%이고, IC

50는 20μg/ml로 측정되어, 검색한 천연물 중에서 황련이 가장 강력하게 MAO 활성을 저해하는 것으로 확인되었다.

[실시예 1-4: 황련 엑스의 MAO 저해양상 조사] 여러가지 식물의 메탄올 엑스 중에서 가장 강력한 MAO 저해활성을 나타낸 황련 엑스를 효소반응액 중의 최종농도가 각각 10, 25, 50, 100, 250μg/ml이 되도록 농도별로 처리하고, 전기 실시예 1-3과 동일한 방법으로

로 MAO 활성을 측정하였다. 이 때, 황련 엑스를 처리하지 않고 반응시킨 경우의 MAO 활성을 대조군으로 사용하였다. 그 결과, 전술한 각 농도에 대하여 MAO 활성은 각각 대조군의 63.3, 45.1, 33.9, 25.1 및 15.1%로 나타나, MAO가 황련 엑스에 의하여 용량의존적 방식으로 저해받음을 확인하였다(참조: 표 1). 이러한 결과는 황련 엑스 중에 MAO 활성을 효과적으로 저해할 수 있는 활성물질이 포함되어 있음을 제시하였다.

[표1]

황련 엑스의 MAO 활성 저해효과

황련 엑스의 농도(μg/ml)	MAO 활성(% of control) (nmol/min/mg 단백질)
10	0.190±0.003 (63.3)
25	0.136±0.002 (45.1)
50	0.084±0.001 (33.9)
100	0.061±0.001 (25.1)
250	0.039±0.001 (15.1)

[실시에 2: 황련 엑스의 용매별 분획제조]황련의 용매별 분획을 제조하고자, 먼저 전기 실시에 1-1로부터 수득한 황련의 메탄올 엑스를 200배 용량의 증류수에 현탁시킨 다음, 전기 현탁액과 같은 부피의 디클로로메탄으로 더 이상 색소가 추출되지 않을 때까지 반복하여 추출하였다.이어서, 남아있는 수용액 층을 에탄올아세테이트로 추출하고, 다시 남아있는 수용액 층을 부탄올로 반복추출하였다. 부탄올 추출 후 남아있는 층은 황련 엑스의 물분획으로 사용하였다. 각 용매별 분획을 회전감압농축기를 이용하여 감압농축하고, 이를 4 내지 7℃에 보관하였다.

[실시에 3: 황련 엑스의 용매별 분획의 MAO 저해활성 측정]전기 실시에 2로부터 수득한 황련의 각 용매 분획에 대하여 실시에 1-3과 동일한 방법으로 MAO 저해활성을 검색하였다.이 때, 시료의 효소반응액 중 농도는 100μg/ml과 250μg/ml의 두 가지 농도로 하여 실시하였다. 각 농도에서의 MAO 활성은, 대조군과 비교하여, 디클로로메탄 분획의 경우에는 66.7%와 32.8%, 에탄올아세테이트 분획의 경우에는 42.3%와 13.2%, 부탄올 분획의 경우에는 30.3%와 14.9%, 그리고 물분획의 경우에는 44.5%와 16.0%로, 부탄올 분획의 저해효과가 가장 강한 것으로 확인되었다(참조: 표 2).

[표2]

## 황련 엑스의 용매별 분획이 MAO 활성에 미치는 영향

분획	농도( $\mu\text{g/ml}$ )	MAO 활성(% of control) (nmol/min/mg 단백질)
디클로로메탄	100	$0.197 \pm 0.009$ (66.7)
	250	$0.094 \pm 0.007$ (32.8)
에탄올아세테이트	100	$0.123 \pm 0.004$ (42.3)
	250	$0.035 \pm 0.003$ (13.2)
부탄올	100	$0.090 \pm 0.011$ (30.3)
	250	$0.043 \pm 0.001$ (14.9)
불	100	$0.131 \pm 0.005$ (44.5)
	250	$0.044 \pm 0.001$ (16.0)

[실시에 4: 황련 엑스 부탄올 분획 중의 생리활성 성분의 확인] 전기 실시에 2로부터 수득한 부탄올 분획을  $\text{SiO}_2$  칼럼 크로마토그래피를 이용하여 다시 소분획 I, II, III 및 IV로 분리하였다. 그런 다음, 전기 소분획 I, II, III 및 IV에 대해서 전기 실시에 1-3과 동일한 방법으로 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 두 가지 농도에서 MAO 활성을 조사한 결과, 대조군과 비교하여 MAO의 활성이, 소분획 I의 경우에는 45.1%와 15.1%, 소분획 II의 경우에는 34.3%와 12.5%, 소분획 III의 경우에는 22.8%와 6.6%, 그리고 소분획 IV의 경우에는 4.3%와 0.8%로, 소분획 IV의 저해효과가 가장 큰 것으로 확인되었다(참조: 표 3).

### [표 3]

#### 부탄올 소분획이 MAO 활성에 미치는 영향

분획	농도( $\mu\text{g/ml}$ )	MAO 활성(% of control) (nmol/min/mg 단백질)
소분획 I	100	$0.135 \pm 0.002$ (45.1)
	250	$0.045 \pm 0.003$ (15.1)
소분획 II	100	$0.102 \pm 0.001$ (34.3)
	250	$0.036 \pm 0.001$ (12.5)
소분획 III	100	$0.067 \pm 0.003$ (22.8)
	250	$0.018 \pm 0.001$ ( 6.6)
소분획 IV	100	$0.011 \pm 0.001$ ( 4.3)
	250	$0.001 \pm 0.001$ ( 0.8)

이어서, 소분획 I~IV를 각각 TLC(thin layer chromatography)로 분리하여, 황련의 활성성분을 확인하였다. 이 때, TLC플레이트로는 머크사(Merck Co., Germany)로부터 구입한 Kieselgel 60 F254 플레이트를 사용하였으며, 이소프로판올:포름산:물 = 80:1:20 (v/v/v)인 전개용매를 사용하여 표준물질과 함께 시료를 전개한 다음, 드라겐도르프(Dragendorff) 시약으로 발색처리하였다. 그 결과, 소분획 I~III의 주성분은 베르베린(berberine)과 팔마틴(palmatine)이고, 소분획 IV의 주성분은 코프티신(coptisine)임을 확인하였다.

이와 같은 결과로부터, 황련의 성분 중 MAO 저해활성을 가지고 있는 주물질은 이소퀴놀린 계열의 프로토베르베린 알칼로이드(protoberberine alkaloid) 화합물인 코프티신, 베르베린 및 팔마틴임을 확인하였다.

[실시에 5: 코프티신, 베르베린 및 팔마틴에 의한 MAO 활성 저해효과] MAO 저해활성을 가지고 있는 것으로 확인된 코프티신, 베르베린 및 팔마틴 등의 단일 활성물질이 MAO 활성에 미치는 영향을 보다 자세히 조사하였다. 이 때, 시료의 농도를 달리한 점을 제외하고는, 전기 실시에 1-3과 동일한 방법으로 MAO 활성을 측정하고, IC

$IC_{50}$  값을 결정하였다. 그 결과, 코프티신의 효소 반응액중 농도가 3, 9, 15 $\mu$ M인 경우의 MAO 활성은 각각 대조군의 71.5, 49.2, 36.2%이고,  $IC_{50}$ 는 8.7 $\mu$ M이었고; 베르베린의 효소 반응액 중 농도가 25, 50, 100 $\mu$ M인 경우의 MAO 활성은 각각 대조군의 70.6, 60.8, 48.9%이고,  $IC_{50}$

는 98.2 $\mu$ M이었으며; 팔마틴의 효소 반응액중 농도가 25, 50, 100 $\mu$ M인 경우의 MAO 활성은 각각 대조군의 75.4, 59.9, 47.6%이고,  $IC_{50}$

는 90.6 $\mu$ M이었다(참조: 표 4).

#### [표 4]

#### 코프티신, 베르베린 및 팔마틴의 MAO 활성 저해효과

화합물	농도 ( $\mu$ g/ml)	MAO 활성(% of control) (nmol/min/mg 단백질)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
코프티신	3	$0.229 \pm 0.006$ (71.5)	8.7
	9	$0.157 \pm 0.010$ (49.2)	
	15	$0.116 \pm 0.009$ (36.2)	
베르베린	25	$0.226 \pm 0.028$ (70.6)	98.2
	50	$0.195 \pm 0.001$ (60.8)	
	100	$0.156 \pm 0.001$ (48.9)	
팔마틴	25	$0.241 \pm 0.012$ (75.4)	90.6
	50	$0.192 \pm 0.015$ (59.9)	
	100	$0.152 \pm 0.007$ (47.6)	

$IC_{50}$  값으로 비교한 MAO 활성 저해 정도는 코프티신 > 팔마틴 > 베르베린의 순으로 나타났으며, 이는 전기 화합물들의 화학적 구조 면에서 고찰하면, 코프티신은 환구조의 9,10번 치환기가  $-O-CH_2-O-$ 이고, 베르베린과 팔마틴은  $-OCH_3$ 이므로, 프로토베르베린 알카로이드 화합물의 환구조 중 9,10번 위치의 치환기가 MAO 활성을 저해하는데 있어 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

한편, 코프티신, 베르베린 및 팔마틴의 MAO 활성저해 작용기전을 조사하기 위하여, 키누라민을 기질로 사용하여 K

$i$  값을 측정 한 결과, 베르베린과 팔마틴은 비상경적 저해(noncompetitive inhibition) 양상을 보였으며,  $K_i$  값은 각각  $44.2 \pm 6.4 \mu$ M와  $58.9 \pm 3.7 \mu$ M이었다(참조: 제1(a)도 및 제1(b)도). 제1(a)도에서, (1), (2) 및 (3)은 각각 0 $\mu$ M, 25 $\mu$ M 및 50 $\mu$ M 베르베린을 처리한 경우를 나타내며; 제1(b)도에서, (1), (2) 및 (3)은 각각 0 $\mu$ M, 25 $\mu$ M 및 80 $\mu$ M 팔마틴을 처리한 경우를 나타낸다. 반면, 코프티신은 상경적 저해(competitive inhibition) 양상을 보였으며,  $K_i$  값은  $3.4 \pm 0.6 \mu$ M이었다(참조: 제1(c)도). 제1(c)도에서, (1), (2), (3) 및 (4)는 각각 0 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 9 $\mu$ M 및 15 $\mu$ M 코프티신을 처리한 경우를 나타낸다. 이 때, 대조군 MAO의 K

$m$  값은  $78.2 \pm 4.0 \mu$ M이었고, V

$_{max}$  값은  $0.65 \pm 0.05$  nmol/min/mg 단백질이었다.

[실시예 6: 레제르핀(reserpine)에 의한 직장체온 강하에 대한 코프티신 및 베르베린의 길항효과]일반적으로 약물의 항우울성 검사에는 레제르핀이나 아포모르핀(apomorphine)에 의한 체온강하에 대한 길항실험, 강제수영실험, 요힘빈(yohimbine)의 독성 증가실험 및 꼬리현수법 등이 사용되고 있다. 본 발명자들은 우수한 MAO 저해활성을 가지는 것으로 확인된 코프티신, 베르베린 및 팔마틴의 항우울제로서의 응용여부를 조사하기 위하여, 다음과 같은 방법으로 체온강하 길항실험을 진행하였다:

체중이 약 20 내지 25g인 ICR 웅성 마우스를 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하면서, 12시간의 밤낮주기로  $22 \pm 2^\circ$ C에서 사육하였다. 하루중 일정시간을 택해 전기 온도조건 하에서 각 마우스의 직장체온을 측정하고, 1% 시트르산 용액에 0.25mg/ml의 농도로 용해시킨 레제르핀을 2.5mg/kg 체중의 양으로 복강주사하였다. 약물투여 후 1시간 마다 직장체온을 측정한 결과, 경시적인 체온강하가 관찰되었다.

이어서, 레제르핀에 의한 직장체온 강하에 대한 코프티신 및 베르베린의 길항효과를 조사하고자, 전기와 동일한 조건에서 레제르핀을 마우스에 복강주사하고 3시간 동안 방치한 다음, 직장체온을 측정하여 유사한 체온을 가진 마우스들을 분류하여 30분 동안 안정시키고, 대조군으로 사용할 마우스를 제외하고 주사용 증류수에 녹인 시료용액을 다양한 용량으로 복강주사하였다. 1시간 30분이 경과한 다음, 다시 직장체온을 측정한 결과, 코프티신 0.2mg/kg, 1mg/kg 및 5mg/kg을 주사한경우의 직장체온은 각각  $34.2\pm0.44^{\circ}\text{C}$ ,  $34.3\pm0.64^{\circ}\text{C}$  및  $34.5\pm0.54^{\circ}\text{C}$ 이었으며, 초기에 레제르핀만을 주사한 대조군의 직장체온은  $33.4\pm0.51^{\circ}\text{C}$ 이었다(참조: 제2(a)도). 또한, 베르베린 0.1mg/kg, 1mg/kg 및 10mg/kg을 주사한 경우의 직장체온은 각각  $34.6\pm0.44^{\circ}\text{C}$ ,  $34.7\pm0.67^{\circ}\text{C}$  및  $35.1\pm0.41^{\circ}\text{C}$ 이었으며, 대조군의 직장체온은  $34.0\pm0.38^{\circ}\text{C}$ 이었다(참조: 제2(b)도). 이와 같이, 코프티신과 베르베린은 직장체온 강하에 대한 길항작용 능력을 가지고 있음이 확인되었으며, 베르베린과 유사한 정도의 MAO 저해활성을 가지는 팔마틴 또한 이러한 효과를 가지고 있을 것으로 유추할 수 있다. 따라서, 이러한 결과는코프티신, 베르베린 및 팔마틴이 항우울제의 주성분으로서 사용될 수 있음을 강력하게 제시하였다.

[투여방법 및 효과량]항우울제로서 사용되는 코프티신, 베르베린 및 팔마틴의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 코프티신은 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 1일 1회 300 내지 900mg(복강주사) 또는 3 내지 9g(경구투여)으로 투여하는 것이 바람직하고; 베르베린은 600 내지 1800mg(복강주사) 또는 6 내지 18g(경구투여)으로 투여하는 것이 바람직하며; 및, 팔마틴은 600 내지 1800mg(복강주사) 또는 6 내지 18g(경구투여)으로 투여하는 것이 바람직하다. 한편, 전기투여량은 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.

본 발명의 코프티신, 베르베린 또는 팔마틴을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 경구 또는 주사형태로 투여할 수 있다. 경구용 조성물로는, 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성성분 이외에 희석제(예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활착제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리딘)를 함유하며, 경우에따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[급성독성 시험]본 발명에서 항우울제로서 사용되는 코프티신 및 팔마틴의 급성독성을 랫트를 이용하여 시험하였다. 코프티신 및 팔마틴을 각각 랫트에 복강주사하고, 7일간에 걸쳐 사망한 마우스의 수를 관찰하여 LD

50 값을 결정하였다. 그 결과, 코프티신의LD

50 값은 1.5g/kg, 팔마틴의 LD

50 값은 600mg/kg이었다. 한편, 베르베린의 랫트에서의 LD

50 값은 90mg/kg(복강주사)으로 알려져 있다(참조: Tang, W. and Eisenbrand, G., Chinese Drugs of Plant Origin, pp. 362-371, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York). 따라서, 상기 효과량의 범위에서 본 발명의 코프티신, 베르베린 또는 팔마틴을 함유하는 항우울제는 충분히 안전한 약물임을 알 수 있었다.

### 발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 모노아민 산화효소 저해활성을 가지는 프로토베르베린 알카로이드 화합물을 유효성분으로 함유하는 항우울제를 제공한다. 이소퀴놀린 계열의 프로토베르베린 알카로이드 화합물인 코프티신,베르베린 및 팔마틴은 생체내 신경전달물질인 모노아민 류를 불활성화시키는 것으로 알려진 모노아민 산화효소의 활성을 강력하게 저해하므로, 본 발명의 항우울제는 우울증 치료에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

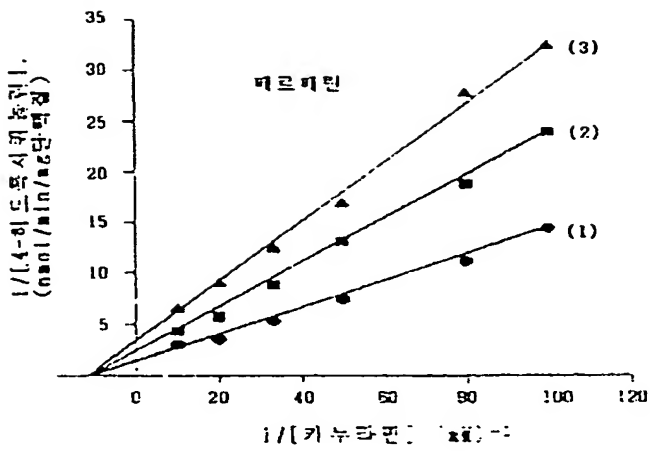
### (57)청구의 범위

#### 청구항1

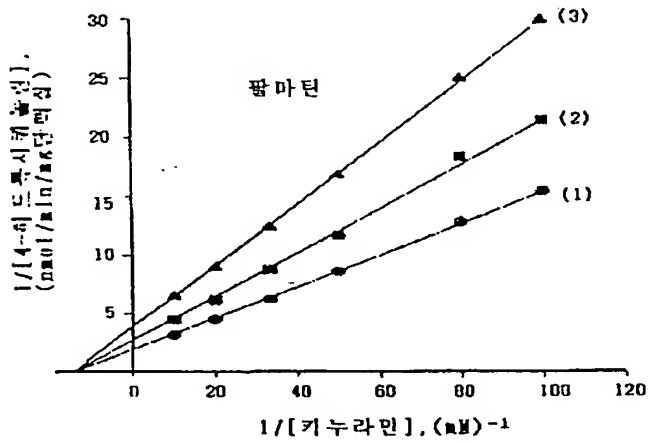
모노아민 산화효소 저해활성을 가지는 코프티신, 베르베린 또는 팔마틴을 유효성분으로 함유하고, 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항우울제.

#### 도면

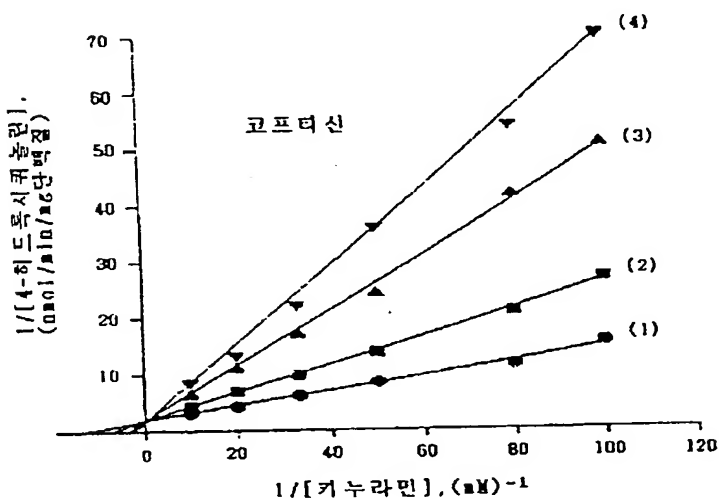
##### 도면1a



도면1b

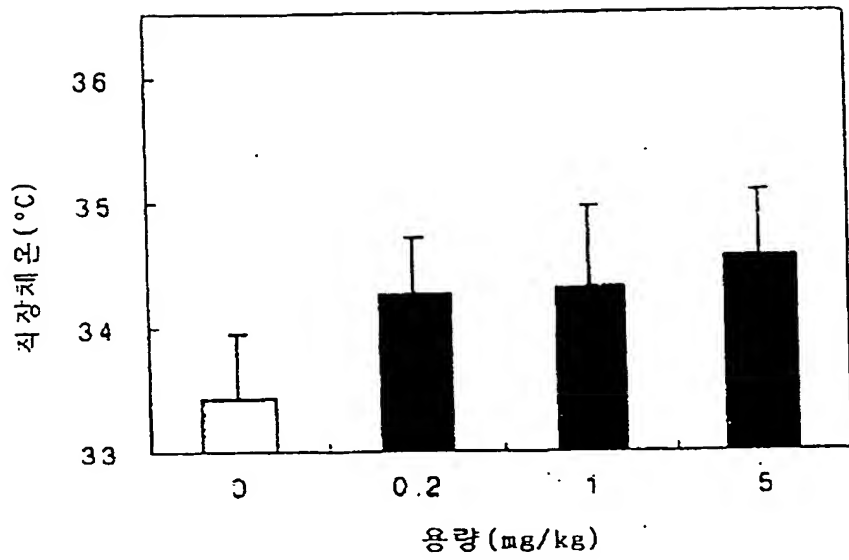


도면1c



도면2a





도면2b

